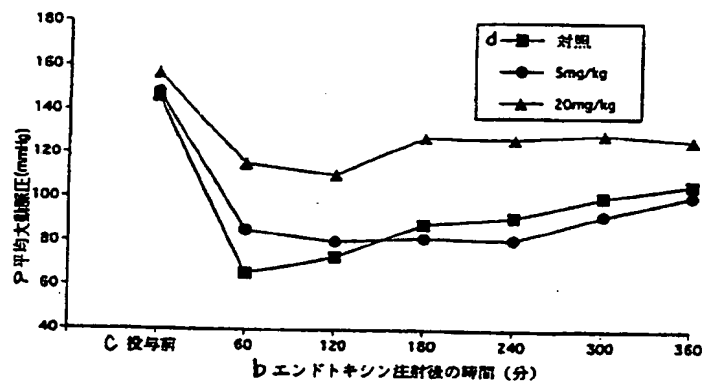




(51) 国際特許分類6 A61K 31/525, C07D 475/14		A1	(11) 国際公開番号 WO97/36594
			(43) 国際公開日 1997年10月9日(09.10.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01079		(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) 国際出願日 1997年3月28日(28.03.97)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平8/78698 1996年4月1日(01.04.96) JP 特願平9/91352 1997年3月27日(27.03.97) JP			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 荒木誠一(ARAKI, Seiichi)(JP/JP) 〒300 茨城県土浦市永国1126-9 Ibaraki, (JP) 鈴木 護(SUZUKI, Mamoru)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市松代1-30-2 Ibaraki, (JP) 渡辺直彰(WATANABE, Naoaki)(JP/JP) 〒305 茨城県つくば市小野川7-27 Ibaraki, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 高木六郎, 外(TAKAGI, Rokuro et al.) 〒105 東京都港区西新橋1丁目18番6号 童宝ビル Tokyo, (JP)			

(54)Title: VITAMIN B₂-CONTAINING MEDICINES(54)発明の名称 ビタミンB₂ 含有医薬

a ... Mean aortic pressure (mmHg)

b ... Time elapsed after endotoxin injection (min)

c ... before injection

d ... Control

(57) Abstract

Toxin shock preventives or remedies containing vitamin B₂, wherein the vitamin B₂ is riboflavin, sodium riboflavin phosphate, flavin mononucleotide, and/or flavin adenine dinucleotide.

(57) 要約

ビタミンB₂を含有するトキシシンショック予防治療剤であり、ここにビタミンB₂は、リボフラビン、リン酸リボフラビンナトリウム、フラビンモノヌクレオチド及び/又はフラビンアデニンジヌクレオチドである。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロベニア共和国
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MR	モロッコ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KZ	キルギスタン	NO	ノルウェー		ジンバブエ
CU	キューバ	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ共和国	KG	大韓民国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KH	カンボジア	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
EE	エストニア	LI	スイス	RU	ロシア連邦		
		LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

ビタミンB₂含有医薬

技術分野

5 本発明は、ビタミンB₂を含有するトキシンショック予防治療剤に関する。更に詳しくは、本発明はビタミンB₂を含有する細菌由来のトキシンショック予防治療剤に関する。

背景技術

10 ビタミンB₂は、リボフラビン及びその誘導体の別名であり、天然には肝臓、ビール酵母、牛乳、肉、卵、緑色野菜等に多く含まれる物質である。薬物としては口角炎、口唇炎、舌炎、急・慢性湿疹、脂漏性湿疹、ペラグラ等の疾患の予防治療剤として用いられる。ビタミンB₂は生体内では結合型すなわち、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の形で存在し、
15 フラビン蛋白質又はフラビン酵素と呼ばれる酸化還元酵素の補欠分子族として機能し、糖、脂質、アミノ酸の酸化的分解やミトコンドリアやミクロソームの電子伝達において中心的役割を果たしている。また、近年、免疫賦活・感染防御剤としての作用も見いだされている (特開平5-201864号公報)。

20 トキシン (毒素) はヒトや動物に対して毒性を有し、かつ抗原性をもつ物質のことである。その起源に由来して、動物由来毒素、植物由来毒素及び細菌由来毒素 (菌体内毒素 (エンドトキシン)、菌体外毒素 (エンテロトキシン)) に分類される。腸内細菌の菌体抗原、すなわちO抗原 (O特異多糖抗原) はエンドトキシン (内毒素、
25 菌体内毒素) と呼ばれ、細菌の細胞壁の一部を構成する高分子毒性物質であって、多糖体と、脂質と、タンパク質との複合体である。しかして、菌が動物体内で分解したとき、遊離し、ショックすなわち、エンドトキシンショックを示す。換言すれば、エンドトキシン

ショックは大腸菌、変型菌、緑膿菌などの菌体内毒素（エンドトキシン）を産生するグラム陰性桿菌の感染によって起こるショック状態を意味する。そして、病状が進行すると、低循環状態に移行し、DIC（Disseminated Intravascular Coagulation、播種性血管内血液凝固症候群）を併発しやすい。一方、細菌の産生する毒素のうち、菌体外に遊出する毒素は菌体外毒素（エンテロトキシン）と呼ばれる。菌体外毒素（外毒素）は、高分子タンパク質で熱に不安定であり、毒性が極めて強い。

エンドトキシンショックの治療は、感染源の手術的除去をまず行い、感染菌に感受性を有する抗生物質または広範囲抗菌スペクトルを有する抗生物質を投与する方法がまずとられる。また、近年、抗エンドトキシン作用を有する化合物の開発も盛んに行われ、例えば、特開昭60-158172号公報、特開昭61-293954号公報、特開昭60-243047号公報、特開平2-131467号公報等として開示されている。

従来の治療は、感染した菌に有効な抗生物質を探索するのに多大な時間と労力を要した。また、抗エンドトキシン作用を有する薬剤はその安全性及び効果の面から十分ではなく、更に有効な薬剤及びエンドトキシンとエンテロトキシンとの両者に有効な薬剤の開発が求められている。

発明の開示

本発明者は、上記問題点を解決するため鋭意検討した結果、以下に示す手段により問題を解決できることを見出し本発明を完成した。

本発明は、ビタミンB₂を含有するトキシンショック予防治療剤である。更に詳しくはビタミンB₂を含有する細菌由来のトキシンショック予防治療剤である。

発明を実施するための最良の形態

本発明にかかるビタミンB₂とは、リボフラビン、リン酸リボフラビンナトリウム、フラビンモノヌクレオチド(FMN) またはフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD) である。本発明においてビタミンB₂の投与量は、体重1 k gあたり、0.1mg から100mg であり、好ましくは0.5mg から50mgであり、より好ましくは1mg から25mgである。ビタミンB₂の投与方法は、特に限定されないが、重篤なショック状態の場合は注射剤として投与することが好ましく、症状が軽い場合は経口又は直腸からも投与できる。

ビタミンB₂は、投与による過剰症は知られておらず、非常に安全性の高いビタミンである。

本発明にかかるビタミンB₂を注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等とするには従来用いられる技術により製造することができる。しかして、本発明にかかるビタミンB₂のうち、リボフラビンを注射剤とするには、リボフラビンが水に難溶性であるため、ニコチン酸アミド等の溶解補助剤、合成界面活性剤又はレシチン等を用いて注射剤とする必要がある。

本発明にかかるビタミンB₂を含有するトキシンショック予防治療剤の作用機序は明らかではない。トキシンショックは、生体内でインターロイキン1、インターロイキン6 及び腫瘍壊死因子(TNF) などが過剰に放出され、ショック死に至るとされている。トキシン投与後に産生される血清中の過剰な腫瘍壊死因子産生は、ビタミンB₂の投与によって抑制されることから、ビタミンB₂は、これらサイトカイン(cytokine、細胞間の情報の伝達を担う蛋白性の化学物質)が過剰に放出されるのを抑制することが示唆される。

図面の簡単な説明

図1はビタミンB₂投与による平均大動脈圧の変化を示すグラフ図である。

図 2 はビタミンB₂投与による心拍出量の変化を示すグラフ図である。

図 3 はビタミンB₂投与による心拍数の変化を示すグラフ図である。

図 4 はビタミンB₂投与による平均肺動脈圧の変化を示すグラフ図である。

実施例

以下に本発明にかかるエンドトキシンショック予防治療剤及びエンテロトキシンショック予防治療剤の効果を実施例によって詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例のみに限定されない。

実施例 1

動物としてはSLC:ICR 雄性マウスを用いた。エンドトキシンとしては、大腸菌 *Escherichia coli* 血清型0127-B8 由来リポポリサッカライド（シグマ社製：以下LPS と称す）を使用し、注射用生理食塩水に溶解して使用した。また、ビタミンB₂としては、リン酸リボフラビンナトリウムを用い、注射用蒸留水に溶解後、0.22 μ m のフィルターにより滅菌濾過して5 w/v %の注射液を得た（以下本試料と称する）。対照試料として注射用蒸留水を用いた。

マウスにエンドトキシンの50 mg/kg の接種を本試料又は対照試料の投与前24時間及び投与と同時に並びに投与後にそれぞれ静脈内投与した。そして、投与4日後の生存率を測定した。効果は χ^2 検定により統計学的に比較した。それらの結果を、表1及び表2に示した。

表 1

試料及び投与量	試料投与時間 (hr)	生存率 (%)
対照 (生理食塩水 0.2ml)	-24, 0, 3, 6, 24	2/10(20)
ビタミン B ₂ 1.25mg/kg	-24, 0, 3, 6, 24	4/10(40)
ビタミン B ₂ 2.5mg/kg	-24, 0, 3, 6, 24	6/10(60)
ビタミン B ₂ 5mg/kg	-24, 0, 3, 6, 24	7/10(70)*
ビタミン B ₂ 10mg/kg	-24, 0, 3, 6, 24	7/10(70)*
ビタミン B ₂ 20mg/kg	-24, 0, 3, 6, 24	9/10(90)**

* : P<0.05

** : P<0.01

表 2

試料及び投与量	試料投与時間 (hr)	生存率 (%)
対照 (生理食塩水 0.2ml)	-24, 6	2/10(20)
ビタミン B ₂ 0.5mg/kg	-24	4/10(40)
ビタミン B ₂ 5mg/kg	-24	4/10(40)
ビタミン B ₂ 50mg/kg	-24	6/10(60)
ビタミン B ₂ 0.5mg/kg	6	5/10(50)
ビタミン B ₂ 5mg/kg	6	6/10(60)
ビタミン B ₂ 50mg/kg	6	7/10(70)*
ビタミン B ₂ 0.5mg/kg	-24, 6	5/10(50)
ビタミン B ₂ 5mg/kg	-24, 6	7/10(70)*
ビタミン B ₂ 50mg/kg	-24, 6	8/10(80)**

* : P<0.05

** : P<0.01

表 1 より、本試料の 1.25, 2.5, 5, 10, 20mg/kg の各投与量を LPS 投与 24 時間前、同時、3 時間、6 時間及び 24 時間後に投与すると、対照群の生存率が 20% であるのに対し、本試料を投与するといずれの投与量も生存率の上昇を示した。特に、5, 10 及び 20mg/kg の投与では、有意な生存率の上昇を示し、顕著な強いエンドトキシン

5 5 ショック予防効果が認められた。
また、表 2 より、本試料の 0.5, 5, 50mg/kg の各投与量を LPS 投与 24 時間前又は 6 時間後に投与すると、対照群の生存率 20% に対し、いずれの投与量及び投与タイミングでも高い生存率を示した。特に、LPS 投与 6 時間後の本試料 50mg/kg 投与においても有意な生存率の上昇を示したことから、本発明にかかる試料がエンドトキシン

実施例 2

15 硫酸アトロピン (0.05 mg/kg, i. m.)、ベントバルビタール Na (25 mg/kg, i. v.) にて全身麻酔を行い、臭化バンクロニウム (0.2mg/kg, i. v.) を投与した後、調節呼吸下で実験を行った。供試犬は、ビーグル犬 (15 頭) を薬剤投与量により 3 群に分け用いた。実験は、供試犬に対して大動脈、肺動脈及び左心室内にカテーテルを留置した後、循環動脈が安定した段階でエンドトキシン投与前値の測定を行い、引き続きエンドトキシンを 0.1mg/kg/hr の速度で持続点滴投与を 6 時間行いエンドトキシンショックモデルを作成した。治療 I 群 (5 頭) には、エンドトキシン投与開始直前及び開始後 180 分にビタミン B₂ 5mg/kg を静脈内投与した。治療 II 群 (5 頭) には、

20 25 エンドトキシン投与開始 24 時間前、直前及び開始後 180 分にビタミン B₂ 20mg/kg を静脈内投与した。対照群 (5 頭) には、同量の生理食塩水 (コントロール) を投与した。測定は、エンドトキシン投与開始後 360 分まで行った。

ビタミンB₂投与による平均大動脈圧の変化、心拍出量（心臓から排出される血液の量）の変化、心拍数（心臓の鼓動数）の変化及び平均肺動脈圧の変化を、それぞれ、図1、図2、図3及び図4に示す。

5 これら図1～図4からビタミンB₂ 20mg/kg投与により、エンドトキシンショック時の循環動態例えば平均大動脈圧、心拍出量などを有意に改善することが認められ、エンドトキシンショック時の予防治療薬としての有効性が示された。

10 実施例3

供試動物としてs l c : I C R雄マウス（5～6週令、体重28～32g）を日本エスエルシー（株）より購入し、馴化後使用した。マウスを一群10匹用い、生理食塩水で溶解させたリン酸リボフラビンナトリウム（B₂Na）を20mg/kgの割合で、黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシン（SEB）の接種24時間前、接種直後および3時間後の3回静注投与した。一方、対照群として、生理食塩水を同容量投与した。SEB（30μg/マウス）は、D-ガラクトサミン（40mg/マウス）と混合して腹腔内に接種した。接種後4日後の生存率を測定することによって、B₂Naのトキシンショックに対する
15 20 防御効果を判定した。その結果を表3に示した。

表3

試料及び投与量	試料投与時間 (hr)	生存率 (%)
対照 (生理食塩水 0.2ml)	-24, 0, 3	1/10 (10)
B ₂ Na (20mg/kg)	-24, 0, 3	8/10 (80)**

** P<0.01

25 表3より、黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシンによるショック

死に対して、対照群の生存率が10%に対し、 B_2Na の投与(20mg/kg)では、80%と有意な生存率の上昇が認められた。このことから B_2Na はグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンショックに対しても防御効果を示すことが認められた。

5 産業上の利用可能性

本発明は、トキシンショック予防治療剤であって、トキシンショックにより誘発されるDICの予防治療剤としても有効である。DICとは播種性血管内血液凝固症候群若しくは広汎性血液凝固症候群とも呼ばれ、感染症などの基礎疾患を背景に、組織トロンボプラスチンの血中への放出や、血管内皮障害などによる凝固系の活性化をトリガーとして起こり、全身性に微小血栓が多発し、臓器障害を起こすとともに、線溶系の活性化が亢進され、顕著な出血傾向を示す疾患である。また、本発明の予防治療剤は、グラム陰性菌によるエンドトキシンショックだけではなく、グラム陽性菌によるエンテロトキシンショックにも有効である。

10

15

請 求 の 範 囲

1. ビタミンB₂を含有するトキシンショック予防治療剤。
2. ビタミンB₂が、リボフラビン、リン酸リボフラビンナトリウム、フラビンモノヌクレオチド及びフラビンアデニンジヌクレオチドである請求項1記載のトキシンショック予防治療剤。
- 5 3. トキシンが細菌由来トキシンである請求項1記載のトキシンショック予防治療剤。
4. 細菌由来トキシンが菌体内トキシン又は菌体外トキシンである請求項3記載のトキシンショック予防治療剤。
- 10 5. ビタミンB₂を注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤又はカプセル剤の形態とする請求項1記載のトキシンショック予防治療剤。
6. リボフラビンを、溶解補助剤、界面活性剤又はレシチンによって注射剤とする請求項1記載のトキシンショック予防治療剤。
7. 溶解補助剤がニコチン酸アミドである請求項6記載のトキシンショック予防治療剤。

1/2

図 1

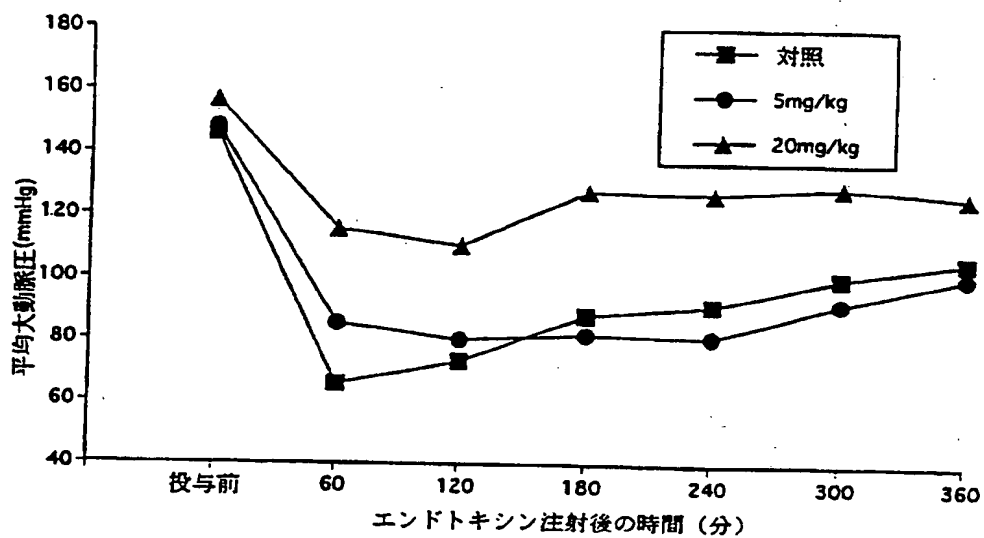
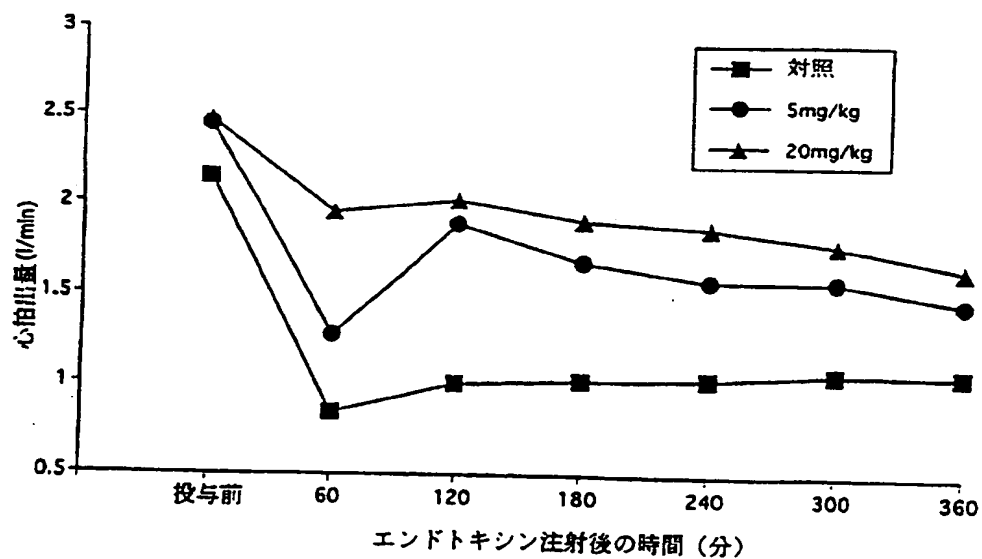


図 2



2/2

図 3

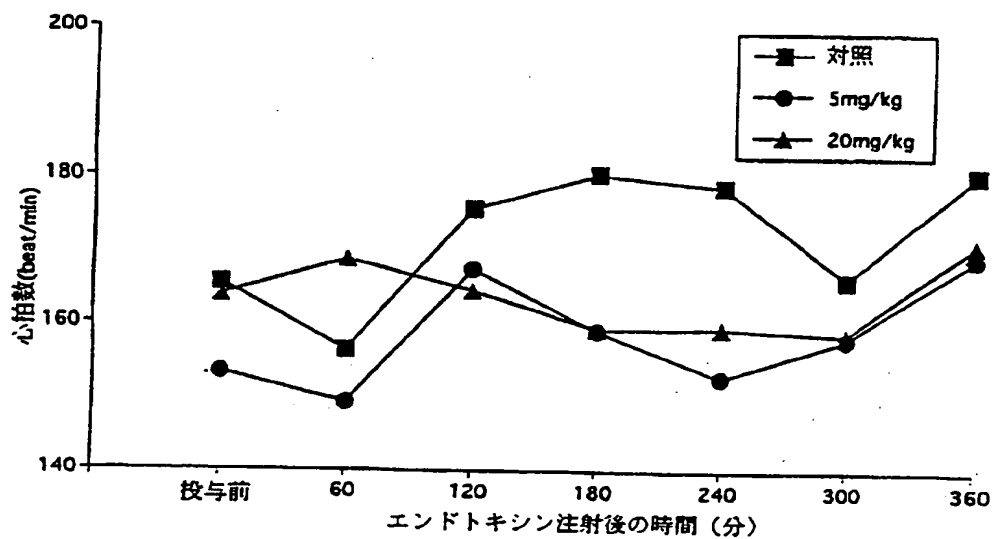
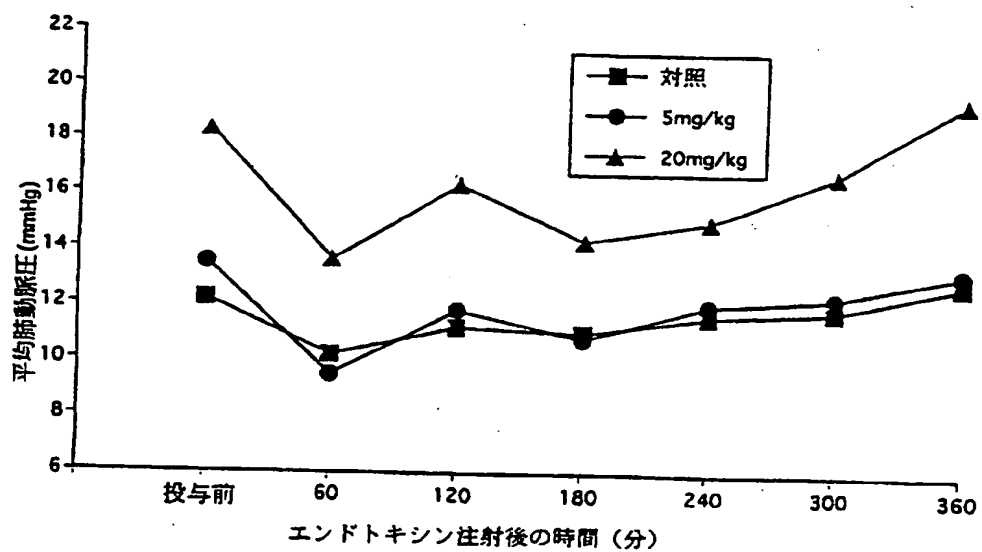


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K31/525, C07D475/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K31/525, C07D475/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-201864, A (Eisai Co., Ltd.), August 10, 1993 (10. 08. 93) & EP, 679398, A	1 - 7
A	JP, 1-146819, A (Sand AG.), June 8, 1989 (08. 06. 89) & EP, 319463, A & US, 4956381, A	1 - 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 10, 1997 (10. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/525, C07D475/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/525, C07D475/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP5-201864, A (エーザイ株式会社) 10. 8月. 1993 (10. 08. 93) &EP679398, A	1-7
A	JP1-146819, A (サンド・アクチェンゲゼルシャフト) 8. 6月. 1989 (08. 06. 89) &EP319463, A&US4956381, A	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 05. 97

国際調査報告の発送日

10. 06. 97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 美香

4C

9271

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.